

И.В. Булычева, Н.Е. Кушлинский, Ю.Н. Соловьев, М.Д. Алиев

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ХОНДРОСАРКОМЕ И ПОГРАНИЧНЫХ ХРЯЦЕВЫХ ОПУХОЛЯХ

ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва

Среди широкого спектра злокачественных новообразований опухоли костей занимают особое место в патологии человека, являясь в диагностическом аспекте одним из наиболее сложных разделов. Диагностика и лечение хрящевых новообразований скелета являются одними из самых малоизученных и трудных областей в онкологии, при этом хрящевые опухоли значительно различаются по морфологии, клиническому течению и биологическим проявлениям, а оценка их прогноза на основе изучения только гистологических препаратов крайне затруднительна. Нередко доброкачественные опухоли проявляют себя в последующем активным и агрессивным течением, а злокачественные опухоли могут протекать латентно. Применение дополнительных иммуногистохимических показателей экспрессии ряда маркеров является высокоэффективным методом, помогающим в решении одной из наиболее сложных задач, проведении дифференциальной диагностики между агрессивной (пограничной) хондромой и высокодифференцированной хондросаркомой, и что особенно важно, при выделении группы больных с менее агрессивно протекающими хрящеобразующими опухолями, для которых возможно применение сохраненных хирургических операций с хорошими отдаленными результатами лечения. Атипичские хрящевые опухоли/высокодифференцированная хондросаркома отличаются местно агрессивным течением и редко метастазируют, лишь малый процент IDH1-мутаций могут быть выявлены при помощи специфического IDH12R132H-антитела. Степень дифференцировки опухоли является важнейшим критерием прогноза. В первичной опухоли у преобладающего числа больных с хондросаркомой кости выявляется экспрессия матриксных металлопротеиназ (ММР) и их тканевого ингибитора 1-го типа (ТИМР-1): ММР-1 (84,6%), ММР-2 (71,8%), ММР-9 (97,4%), ТИМР-1 (82,3%), а уровни экспрессии вышеуказанных маркеров могут колебаться от 10 до 60%. Наличие в хондросаркомах экспрессии ММР-1 указывает на неблагоприятное течение заболевания и достоверно связано с показателями безрецидивной и общей выживаемости больных, а Вах – с безрецидивной выживаемостью. Высокий коэффициент соотношения уровня экспрессии ММР-1/ТИМР-1 является достоверным признаком агрессивного биологического потенциала у больных с пограничными хондромами. Специфичность ММР-1 к фибриллярному коллагену, а ММР-2 к структурам базальных мембран играет ведущую роль в протеолитической активности и инвазивности опухоли. Соотношение экспрессии ММР/ТИМР-1 может являться прогностическим критерием, определяющим местный инвазивный рост и метастазирование хрящеобразующих опухолей с различным биологическим потенциалом. Мультидисциплинарный подход, сочетающий клинические, рентгенологические, молекулярно-биологические и генетические данные, трудно переоценить.

Ключевые слова: атипичские хрящевые опухоли; высокодифференцированная хондросаркома; иммуногистохимия

Биологический потенциал и клинические проявления пограничных хрящевых опухолей и высокодифференцированной хондросаркомы широко варьируют от латентно протекающих, неметастазирующих опухолей до агрессивных сарком. Современная классификация ВОЗ 2013 г. содержит рубрику промежуточных (локально агрессивных) опухолей, в которую входит высокодифференцированная хондросаркома и атипичская хондрома [1, 2]. Насколько сложно провести черту между этими двумя опухолями? Является ли кюретаж надежным хирургическим методом, какова роль и доля морфологического и рентгенологического исследования в постановке диагноза пограничной хрящевой опухоли? Помогает ли иммуногистохимия установить биологический потенциал пограничной хрящевой опухоли? В настоящем исследовании мы постарались найти ответы на поставленные вопросы.

Хондрома (энхондрома) – интрамедуллярная опухоль, состоящая из гиалинового хряща, составляет 15,6% от всех доброкачественных костных опухолей, более половины случаев поражает мелкие кости кистей и стоп. Истончение кортикального слоя кости, патологический перелом, изъеденность внутренней поверхности кортикальной пластинки характерны для хондромы мелких костей. Гистологически хондрома построена из долек хрящевой ткани, клеточность

и митотическая активность в опухоли, как правило, не выражены, отсутствует инфильтративный рост. Метод магнитного резонанса наиболее отчетливо характеризует наличие хрящевой ткани.

Атипичская хондрома выделена в особую рубрику на основании признаков, характеризующих более агрессивное поведение опухоли. Для атипичской хондромы характерна клеточность, очаговый миксоматоз, полиморфизм ядер, повреждение кортикала, патологический перелом, ремоделирование кости, большой объем поражения. Все данные признаки необходимо анализировать в комплексе [3, 4]. Для эффективной диагностики хрящевых новообразований скелета необходим мультидисциплинарный подход, а выбор участка пораженной кости для пункционной биопсии должен обсуждаться коллегиально, причем, гистологические отличия доброкачественных и злокачественных хрящевых опухолей костей часто переплетаются и не всегда ярко выражены. Кроме того, признаки злокачественности могут присутствовать локально только в нескольких мелких фрагментах опухолевой ткани, что приводит к разночтениям, диагностическим неточностям, особенно при мелких биоптатах, а степень дифференцировки хондросаркомы также порой основывается на субъективных морфологических критериях. Рентгенологическая и гистологическая классификация степени зрелости хрящевых опухолей обладает ограниченной прогностической ценностью, а оценка прогноза опухоли на основе изучения гистологических препаратов крайне затруднительна. Нередко доброкачественные опухоли проявляют себя в последующем активным и агрессивным течением, а злокачественные опухоли могут протекать латентно. Для дифференциальной

Для корреспонденции:

Булычева Ирина Владиславовна, д-р мед. наук, врач-патологоанатом
Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
E-mail: irena@boulytcheva.com

диагностики необходимы данные как морфологического, так и рентгенологического исследований, причем по данным Международной экспертной комиссии считается, что доля морфологического исследования (коэффициент k) составляет 0,443 для патологов и 0,345 для радиологов ($p < 0,00001$ для обеих специальностей).

Пограничные хрящевые опухоли клинически и рентгенологически протекают по-разному, в некоторых публикациях указывается на повышенный риск локальных рецидивов щадящих экономных операций [5]. По-прежнему гистологическая степень дифференцировки опухоли является основным прогностическим критерием и не теряет своего значения. В настоящем исследовании рассмотрен ряд молекулярно-биологических маркеров, как возможных показателей "биологического поведения" опухоли [6].

В последние годы особый интерес в клинической онкологии в области изучения костных опухолей привлекают различные тканевые, клеточные и молекулярные маркеры, характеризующие фундаментальные «биологические» свойства опухоли, а именно: пролиферативную и инвазивную способности, активность апоптоза и неоангиогенеза, склонность к метастазированию, в основе способности раковых клеток к инвазивному росту и гематогенному метастазированию может быть активация матриксных металлопротеиназ (ММП), которые участвуют в разрушении внеклеточного матрикса при росте злокачественных опухолей и механизмов неоангиогенеза в первичной опухоли и ее метастазах [7]. При этом известно, что контроль за действием ММП осуществляют тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП). Баланс между экспрессией ММП и ТИМП непостоянен как при физиологических процессах, сопровождающихся ростом и развитием тканей, так и при различных патологиях, в том числе и онкологических заболеваниях. Однако роль ММП и ТИМП в механизмах роста и прогрессии опухолей костей до конца не ясна. В опухолях с высоким соотношением ММП-1/ТИМП-1 увеличенная протеолитическая активность против коллагенов I, II, III типов, а также сниженная экспрессия ТИМП-1, могут вызывать деградацию и ремоделирование внеклеточного матрикса, которые считаются основными признаками метастазирования при хондросаркоме. Все это свидетельствует о прямой связи и влиянии экспрессии ММП-1 и ТИМП-1 в прогрессии хондросаркомы, а их соотношение может служить базой для систем стадирования, оценки степени дифференцировки опухоли, выживаемости и развития локальных рецидивов при хондросаркоме [8, 9].

Циклооксигеназа (СОХ) или простагландин G/H-синтаза является связанным с мембраной ферментом, лимитирующим скорость превращения арахидоновой кислоты (АК) в простаноиды и экспрессируется по крайней мере в трех изоформах. Большая часть ПГЕ₂, продуцируемого в кости, является результатом индукции экспрессии СОХ-2 в остеобластах. В нормальных остеобластах экспрессия СОХ-2 низкая, но легко повышается под воздействием многих факторов, в том числе ПГ в кости [10–12]. Полагают, что продукция СОХ-2 стимулирует формирование зрелой кости остеобластами. Эти эффекты ПГЕ₂ на активацию процессов дифференцировки и снижение пролиферации остеобластов указывают, что обычная экспрессия СОХ-2 в норме оказывает противоопухолевый эффект на остеобласты. Известно, что СОХ-2 играет важную роль в ангиогенезе. В нескольких исследованиях отмечена сильная ассоциация между повышенным уровнем экспрессии СОХ-2 и плохим прогнозом при хондросаркомах, а также при низкой степени дифференцировки опухоли [13–15].

Базальные мембраны, их основные белки и, в частности, коллаген IV типа (Coll-IV) и ламинин служат не только структурным барьером, препятствующим инвазии и метастазированию рака, но и являются важной функциональной единицей, которая участвует в опухолевой прогрессии. Известно, что нарушение взаимодействия клеток опухоли с главными составляющими компонентами базальной мем-

браны, такими как Coll-IV, ламинин, способствует изменению биологического поведения раковых клеток, влияет на их пролиферацию, адгезию и подвижность. Coll-IV относится к нефибриллярным типам коллагена, который образует базальные мембраны как нормальных, так и опухолевых клеток и влияет на биологическую активность новообразований различных локализаций, в том числе и сарком костей.

Особое внимание исследователей привлекает семейство белка Bcl, которое играет важную роль в регуляции митохондриальной цепи апоптоза и состоит из двух классов протеинов: проапоптотических (Bax, Bik, Bak, Bad, Bcl-xs) и антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1). Именно соотношение ингибиторов и активаторов может определять предрасположенность клетки к апоптозу, а при наличии в клетке дефектных молекул Bax нарушается механизм нормальной ее гибели. До настоящего времени не понятно, как белки семейства Bcl ингибируют апоптоз, хотя показано, что эти молекулы взаимодействуют на поверхности митохондрий для поддержания нормального тканевого гомеостаза. Относительно недавно стало ясно, что разбалансирование механизмов апоптоза может быть вовлечено в развитие злокачественного роста, а цитотоксическое действие противоопухолевых препаратов основано на торможении этого процесса. Поэтому пристальный интерес исследователей к использованию антиапоптотических белков, как маркеров злокачественных опухолей связан с тем, что подавление апоптоза этими молекулами может влиять на патогенез, прогрессию и резистентность к противоопухолевой химиотерапии. Экспрессия Bcl-2 выше в периферической, чем в центральной, хондросаркоме. Важно, что в центральных хондросаркомах экспрессия Bcl-2 связана с низкодифференцированными опухолями. Уровни экспрессии Bcl-2 увеличиваются с понижением степени дифференцировки центральной хондросаркомы. Представленные данные предполагают, что в генезе центральных хрящобразующих опухолей активация регуляции Bcl-2 является признаком прогрессии от высокодифференцированных к низкодифференцированным опухолям, что подтверждает различные генетические механизмы, вовлеченные в патогенез центральных и периферических хондросарком.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ 165 случаев хондросаркомы и 46 случаев хондромы за период с 2000 до 2013 г. (рис. 1, а, б, см. на вклейке). Средний возраст пациентов составил 38 лет (24–72 года), среди больных с хондросаркомой преобладали лица мужского пола (98/67), среди больных с хондромой – женского (31/15). Отдаленные результаты прослежены на протяжении не менее 0,6 мес. Всем пациентам применены различные методы хирургического лечения в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН и Московской онкологической больнице № 62. Всем больным проведена диагностика лучевыми методами, включающими КТ и МРТ до лечения и контроль после операции (рис. 2–5, см. на вклейке).

Иммуногистохимическое исследование ММП-1, ММП-2, ММП-9, ТИМП-1, Coll-IV, Bcl-2, Bax, СОХ-2 проведено в 39 хондросаркомах, 8 атипических хондромах и 24 хондромах различной локализации.

Иммуногистохимическое исследование выполнено на парафиновых срезах тканей опухолей с помощью биотинстрептавидинового иммунопероксидазного метода с антителами к ММП-1, 2, 9, ТИМП-1, компоненту базальных мембран коллагену IV типа (Coll-IV), белкам-регуляторам апоптоза (Bcl-2, Bax), а также ферменту циклооксигеназе 2-го типа (СОХ-2). Для всех использованных в исследовании антител применяли одинаковую схему постановки иммуногистохимической реакции.

Образцы тканей фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 48 ч, затем подвергали декальцинации по общепринятой стандартной методике в растворе 20% муравьиной кислоты и 10% формалина. Проводку материала осуществляли в автоматическом режиме в вакуумном процессоре Axcelsior («Termo Scientific», США). После гистологической проводки материал заливали в парафин и затем

готовили срезы толщиной 3–4 мкм. Для работы с образцами опухолевых тканей применяли специальные высокоадгезивные стекла фирмы «Dako» (Дания).

Для работы со срезами костеобразующих опухолей использовали модуль предподготовки PT-Link («Dako»), позволяющий одновременно проводить депарафинизацию, регидратацию срезов, а также демаскировку антигенов. Этапы блокирования эндогенной пероксидазы, инкубацию с первичными антителами, визуализирующим реагентом и раствором хромогена проводили на стейнере Autostainer Plus Link («Dako»). Докрашивание срезов гематоксилином, заключение в бальзам или синтетическую среду проводили по общепринятой методике.

Демаскировку антигенов в хрящеобразующих опухолях проводили при температуре 95°C в течение 20 мин в автоклаве. Стекла извлекали и охлаждали в буфере до комнатной температуры, обрабатывали промывочным буфером, дальнейшие этапы исследования выполняли согласно общепринятой схеме. Ингибирование активности эндогенной пероксидазы проводили при помощи нанесения блокирующего раствора перекиси водорода с последующей инкубацией и промывкой в буфере. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 30 мин с последующей промывкой срезов. Инкубацию с визуализирующим раствором «En Vision» проводили при комнатной температуре в течение 30 мин с последующей обработкой промывочным буфером. Далее следовала инкубация с раствором хромогена в течение 5 мин при комнатной температуре под контролем микроскопа. Докрашивание препаратов проводили гематоксилином.

Оценку реакции в клетках первичных злокачественных опухолей костей проводили полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток. Иммуногистохимическую реакцию оценивали как негативную («-» – нет реакции), слабopоложительную («+» – <10% окрашенных клеток), умеренно позитивную («++» – >10% клеток средней интенсивности окраски) и сильно позитивную («+++» – >10% клеток высокой интенсивности окраски). Для каждого антигена оценивали тип специфического окрашивания, который зависел от локализации продукта реакции в клетке (цитоплазматический, мембранный, ядерный, смешанный) (рис. 6–8, см. на вклейке).

Для MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, COX-2, Вах оценивали интенсивность цитоплазматической реакции и количество окрашенных клеток. Оценку реакции в клетках костных опухолей проводили полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток. Иммуногистохимическую реакцию расценивали как негативную («-» – нет реакции) и позитивную («+» – реакция средней и высокой степени интенсивности). Слабую степень выраженности клеточной реакции, а также реакцию стромы в исследование не включали. Результаты реакций с антигенами выражали в процентах с учетом количества окрашенных клеток на 100 учтенных опухолевых клеток в 5 репрезентативных полях зрения, при этом учитывали только среднюю и высокую степени интенсивности окрашивания компонентов опухолевой клетки.

Для Vcl-2 оценивали ядерную экспрессию белка как низкой ($\leq 10\%$ окрашенных опухолевых клеток), средней и высокой интенсивности ($>10\%$ антиген-позитивных клеток в опухоли).

Специфическую реакцию ряда маркеров в волокнах и клетках стромы опухолей расценивали как позитивную или негативную.

Иммунореактивность Coll-IV выявляли по модели экспрессии белков в базальных мембранах опухолей.

Результаты и обсуждение. 5-летняя общая выживаемость пациентов высокодифференцированной хондросаркомой составила 92% независимо от метода хирургического лечения (расширенная или краевая резекция, экскохлеация), 3 пациентов умерли от прогрессирования заболевания и 6 – от других заболеваний. Показатель 5-летней безрецидив-

ной выживаемости пациентов с атипической хондромой составил 96%, в 2 наблюдениях отмечен локальный рецидив, один пациент с локализацией опухоли в челюсти умер от септических осложнений. Локальный рецидив наблюдали у двух пациентов в форме дедифференцированной опухоли. В первом случае опухоль локализовалась в проксимальном отделе плечевой кости, пациенту был первоначально выполнен кюретаж с аллотрансплантацией, во втором случае опухоль локализовалась в костях таза, местный рецидив развился после удаления опухоли методом расширенной резекции. Две пациентки с хондромами и одна с атипической хондромой одновременно страдали раком молочной железы и легкого, патологоанатомическое исследование было проведено с применением дополнительных иммуногистохимических методов, подтверждающих гистогенез опухолей.

В данном разделе исследований проведен сравнительный анализ показателей экспрессии MMP-1, MMP-2, MMP-9 и TIMP-1 в доброкачественных, пограничных и злокачественных хрящеобразующих опухолях костей, оценена их взаимосвязь с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания и прогнозом.

Следует отметить, что ни в одном из образцов доброкачественных хрящеобразующих опухолей костей (хондроме) экспрессия MMP и TIMP-1 не выявлена. При этом в большинстве хондросарком обнаружена экспрессия изученных маркеров: MMP-1 – 84,6%, MMP-2 – 71,8%, MMP-9 – 97,4%, TIMP-1 – 82,3%, а уровни экспрессии вышеуказанных маркеров колебались от 10 до 60%.

Анализ безрецидивной выживаемости больных с хондросаркомой в группах больных с отсутствием и наличием экспрессии MMP-1 выявил достоверные различия ($p=0,048$ по критерию COX's *F-Test*). Так, 3-летняя безрецидивная выживаемость 6 больных с опухолью MMP-1(-) составила 60,0±21,9% (медиана безрецидивной выживаемости не достигнута, так как 4 из 6 больных пережили 3 года и продолжают быть под наблюдением без признаков рецидива заболевания), тогда как у 33 больных с хондросаркомой MMP-1(+) – 28,5±9,4% (медиана безрецидивной выживаемости составила 11,3 мес).

Таким образом, полученные данные указывают на прогностическую значимость определения экспрессии MMP-1 в опухоли больных с хондросаркомой. Наличие экспрессии MMP-1 в хондросаркомах является прогностически неблагоприятным фактором, особенно при уровнях экспрессии маркера $\geq 40\%$.

Частота выявления и уровень экспрессии MMP-2 в хондросаркомах не связаны со степенью ее злокачественности, критерием распространенности процесса Т. Показатели безрецидивной и общей выживаемости больных с хондросаркомой в группах с MMP-2(-) и MMP-2(+) опухолями достоверно не различались. Таким образом, показатели экспрессии MMP-2 в хондросаркомах не отражали основные клинические и морфологические характеристики заболевания, его прогноз.

Обнаружены достоверные ($p=0,007$) различия в снижении показателя 3-летней безрецидивной выживаемости больных с хондросаркомой при увеличении уровня экспрессии белка MMP-9 в опухоли. Так, у 15 больных с показателем экспрессии MMP-9 менее 40% 3-летняя безрецидивная выживаемость равнялась 58,3±16,1% (медиана 34,2 мес), у 10 больных с содержанием MMP-9, равном 40%, – 42,0±17,6% (медиана 15,4 мес), у 14 больных с содержанием MMP-9 в опухоли более 40% – 8,4±8,0% (медиана 8 мес).

Многофакторный анализ показателей безрецидивной выживаемости больных с хондросаркомой с учетом основных клинико-морфологических характеристик и уровня экспрессии белка MMP-9 в опухоли показал, что критерий Т является наиболее определяющим фактором прогноза развития раннего рецидива у больных с хондросаркомой ($p=0,026$), в меньшей степени содержание MMP-9 ($p=0,06$) и степень злокачественности опухоли ($p=0,09$).

В клинически неблагоприятной группе из 33 больных (критерий распространенности опухолевого процесса T2–T3) были установлены достоверные различия в безрецидивной выживаемости больных с хондросаркомой в подгруппах с уровнем экспрессии MMP-9 <40% и MMP-9 ≥ 40% ($p=0,02$). Так, показатель 3-летней безрецидивной выживаемости у 10 больных хондросаркомой равнялся 46,9±18,7% при благоприятных уровнях экспрессии MMP-9 в опухоли (<40%) и у 23 пациентов – 17,3±8,9% при неблагоприятных уровнях экспрессии MMP-9 (≥ 40%).

Таким образом, подводя итоги изучению показателей экспрессии белка MMP-9 в хондросаркомах, отметим, что содержание MMP-9 в ткани этих опухолей отражало степень злокачественности хондросаркомы и распространенности опухолевого процесса по критерию T. Получены данные о высокой прогностической ценности уровня экспрессии MMP-9 в хондросаркомах при развитии раннего рецидива заболевания. Уровень экспрессии белка MMP-9 в хондросаркомах ≥40% является прогностически неблагоприятным, а <40% – благоприятным фактором 3-летней безрецидивной выживаемости. Выявлено, что риск развития рецидива заболевания через 1 год от начала лечения был наибольшим при сочетании критерия T₃ с высоким уровнем экспрессии белка MMP-9 в опухоли.

Отметим также, что из 6 больных с MMP-1(-)-хондросаркомой у 5 (83,3%) выявлены также низкие (<40%) показатели экспрессии MMP-9. Из 33 больных с хондросаркомой кости с наличием экспрессии MMP-1 в опухоли у 13 (39,4%) обнаружены неблагоприятные высокие (≥40%) значения MMP-9 и у 10 (30,3%) – благоприятные уровни MMP-9 (<40%). При этом у больных с неблагоприятными уровнями экспрессии MMP-1 в опухоли различия в показателях 3-летней безрецидивной выживаемости в подгруппах с благоприятными и неблагоприятными уровнями MMP-9 достигали 35% ($p=0,052$), что указывает на необходимость одновременного определения показателей экспрессии MMP-1 и MMP-9 в хондросаркомах.

TIMP-1. Экспрессия TIMP-1 не выявлена в 10 доброкачественных хрящобразующих новообразованиях костей и в 6 (17,6%) из 34 хондросаркомах. При этом уровень экспрессии TIMP-1 в 11 хондросаркомах составил 10%, в 11 – 20%, в 2 – 30% и в 4 – 40%. Не отмечено достоверных различий в частоте выявления TIMP-1 с учетом пола и возраста пациентов.

С увеличением степени злокачественности хондросарком отмечена тенденция к снижению частоты выявления TIMP-1(-)-опухолей ($p=0,4$). Так, при G1 ($n=7$) частота выявления TIMP-1(-)-опухолей равнялась 42,9%, при G2 ($n=11$) – 9,1%, при G3 ($n=8$) и G4 ($n=8$) – по 12,5%. Наиболее часто TIMP-1 не выявляли при вторичной хондросаркоме, TIMP-1 – 33,3%, при центральной хондросаркоме экспрессия TIMP-1 обнаружена в 15,4%, в то время как при других гистологических вариантах хондросарком TIMP-1 не обнаружен.

У больных с хондросаркомой кости уровни экспрессии TIMP-1 в опухоли не связаны с критерием T, показателями безрецидивной и общей выживаемости, а стало быть и прогнозом.

Таким образом, показатели экспрессии TIMP-1 в опухоли больных с хондросаркомой не были достоверно связаны с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания и его прогнозом.

Определили коэффициенты соотношения показателей экспрессии MMP/TIMP-1 в хондросаркомах 28 больных, а также изучили связь этих коэффициентов с клинико-морфологическими признаками заболевания. Показано, что коэффициенты соотношений MMP-1/TIMP-1, MMP-2/TIMP-1, MMP-9/TIMP-1 в хондросаркомах имели тенденцию к увеличению при повышении степени дифференцировки опухоли. Обнаружено, что коэффициенты соотношения MMP-1/TIMP-1, MMP-2/TIMP-1 в хондросаркомах не связаны со стадией заболевания и размерами первичной опухоли.

Вместе с тем в группе больных с G1-G2-степенью дифференцировки хондросаркомы дисперсионный анализ выя-

вил достоверно меньшее соотношение MMP-9/TIMP-1 при увеличении критерия T ($p=0,03$). Так, в группе из больных с критерием T₁ соотношение было наибольшим и составило 3,6±1,0, в группе с критерием T₂ – 1,9±0,2, у больных с критерием T₃ соотношение было минимальным – 1,3±0,7. У больных с хондросаркомой кости с G3-G4-степенью дифференцировки опухоли соотношение MMP-9/TIMP-1 практически не различалось (2,6±0,3 – при T₂; 2,6±0,1 – при T₃). При увеличении степени злокачественности хондросаркомы наблюдали большее содержание MMP-1, чем его ингибитора TIMP-1 в опухоли. У больных с низкой степенью злокачественности хондросаркомы (G1-G2) и при минимальном критерии T выявлено существенно большее содержание MMP-9, чем его ингибитора TIMP-1.

Для анализа прогностической значимости коэффициентов соотношения MMP/TIMP-1 все наблюдения разделили по медиане соотношений на 2 группы и определили отдаленные результаты лечения в этих группах. Так, в группе больных с хондросаркомой при соотношении MMP-1/TIMP-1 менее и более медианы (1,0) получены достоверные различия в показателях общей выживаемости ($p=0,03$). Так, в группе больных с хондросаркомой с соотношением в опухоли MMP-1/TIMP-1 <1,0 все пациенты живы в течение 5 лет проведения исследования, тогда как в группе пациентов с соотношением MMP-1/TIMP-1 ≥ 1,0 показатель 5-летней общей выживаемости составил 36,7±14,0% (медиана 41,4 мес).

Не установлено достоверных различий в показателях безрецидивной выживаемости по величине соотношения MMP-9/TIMP-1. В группе больных с хондросаркомой кости с коэффициентами соотношения в опухоли MMP-1/TIMP-1 < и ≥ медианы (2,0) различия недостоверны ($p=0,06$). Так, в группе больных с хондросаркомой с соотношением MMP-9/TIMP-1 <2,0 все больные были живы в течение 5 лет, а в группе пациентов с соотношением MMP-1/TIMP-1 ≥ 2,0 показатель 5-летней общей выживаемости составил 38,1±14,2% (медиана 43,8 мес).

Таким образом, анализ соотношения показателей MMP-9/TIMP-1 при определении прогноза общей выживаемости больных с хондросаркомой предпочтительнее, чем только одного показателя экспрессии MMP-9 в опухоли (см. рис. 8). В то же время при оценке прогноза безрецидивной выживаемости достаточно определения только экспрессии MMP-9 в хондросаркомах. Прогностическая ценность определения экспрессии одного MMP-1 превышает таковую по сравнению с определением коэффициента соотношения MMP-1/TIMP-1.

Coll-IV. Экспрессия Coll-IV в доброкачественных хрящобразующих новообразованиях костей выявлена только в 2 из 10 наблюдений, а уровень экспрессии Coll-IV равнялся 10%. Экспрессия Coll-IV изучена в 31 хондросаркоме, а выявлена в 21 (67,7%) наблюдении. В 10 (32,3%) хондросаркомах уровень экспрессии Coll-IV равнялся 10%, в 9 (29%) – 20%, по 1 наблюдению экспрессия Coll-IV в опухоли составила соответственно 30 и 40%. Различия в частоте выявления экспрессии Coll-IV между группами доброкачественных и злокачественных хрящобразующих опухолей костей статистически достоверны ($p=0,01$).

Не установлено достоверной связи частоты выявления Coll-IV в хондросаркомах с полом и возрастом больных.

Частота выявления Coll-IV(-)-опухолей при вторичной хондросаркоме была наибольшей и составила 58,3% (7 из 12) и реже при центральной 18,2% (2 из 11) и дедифференцированной 0% (0 из 5) хондросаркомах ($p=0,1$).

Частота выявления Coll-IV(-)-опухолей среди больных с хондросаркомой достоверно снижалась по мере увеличения степени ее злокачественности ($p=0,02$). Так, при G1 ($n=6$) частота выявления Coll-IV(-) опухолей равнялась 83,3%, при G2 ($n=11$) – 27,3%, при G3 ($n=6$) – 16,7% и при G4 ($n=8$) – 12,5%. При этом уровень экспрессии Coll-IV в хондросаркомах не зависел от степени их дифференцировки.

Заметно снижалась частота выявления Coll-IV при увели-

чений критерия распространенности первичной опухоли T. Так, при T₁ экспрессия Coll-IV была наибольшей и выявлена в 75% (3 из 4) опухолей, при T₂ она равнялась 28,6% (6 из 21) и 16,7% – при T₃ (1 из 6).

Несколько лучшие отдаленные результаты лечения отмечены среди больных с Coll-IV(-)хондросаркомой, однако различия статистически недостоверны ($p>0,05$). Следует отметить небольшое число пациентов с выявленной экспрессией Coll-IV в первичной опухоли. Различия между указанными группами в показателях 3-летней безрецидивной выживаемости составили 18,1%, а 5-летней общей выживаемости – 39,1%.

Подводя итоги изучения показателей экспрессии Coll-IV в хрящобразующих новообразованиях костей, следует отметить многократное увеличение частоты выявления маркера в хондросаркомах по сравнению с доброкачественными хрящобразующими новообразованиями, при увеличении критерия T и степени их злокачественности. Прогностическая ценность содержания Coll-IV в хондросаркомах выражена слабее, чем MMP-1 и MMP-9, хотя положительные значения Coll-IV в первичной опухоли в некоторых наблюдениях связаны с прогностически неблагоприятным прогнозом.

СОХ-2. В доброкачественных хрящобразующих новообразованиях кости экспрессия Coll-IV не обнаружена. Экспрессия этого маркера выявлена в преобладающем большинстве хондросарком (72,2%), но частота его обнаружения не зависела от возраста и пола пациентов. У более молодых больных чаще выявляли СОХ-2 в первичной опухоли. Частота выявления СОХ-2(-)хондросарком недостоверно снижалась при увеличении критерия T ($p=0,17$). Так, при T₁ ($n=5$) частота выявления СОХ-2(-)опухолей составила 60%, при T₂ ($n=23$) – 26,1%, при T₃ ($n=8$) – 12,5%. Однако средний уровень экспрессии маркера в опухолях повышался достоверно при увеличении критерия T ($p=0,04$) и составил 10,0±0% при T₁, 12,6±1,5% при T₂ и 20,0±3,1% при T₃.

Частота выявления СОХ-2(-)хондросарком достоверно снижалась по мере увеличения степени злокачественности опухоли ($p=0,03$). Так, при G₁ ($n=8$) частота выявления СОХ-2(-)опухолей составила 62,5%, при G₂ ($n=12$) – 33,3%, при G₃ ($n=7$) – 0% и при G₄ ($n=9$) – 11,1%.

Не обнаружено достоверных различий в показателях безрецидивной выживаемости больных с СОХ-2(-) и СОХ-2(+)-хондросаркомами. Однако выявлена тенденция к увеличению общей 5-летней выживаемости больных хондросаркомой с СОХ-2(-)опухолями по сравнению с СОХ-2(+)-хондросаркомами, соответственно 87,5±11,7 и 35,9±13,3% (медиана 47,9 мес).

Проведен многофакторный анализ полученных результатов, который выявил, что критерий T достоверно определял сроки развития рецидива ($p=0,005$), чем степень злокачественности опухоли ($p=0,18$) и частоту выявления СОХ-2 в новообразовании ($p=0,8$). При многофакторном анализе 5-летней общей выживаемости степень злокачественности достоверно была связана с отдаленными результатами лечения больных с хондросаркомой ($p=0,001$). В то же время, такие признаки как критерий T и выявление экспрессии СОХ-2 в опухоли не были связаны с показателями общей выживаемости ($p=0,5$). Все пациенты со степенью злокачественности хондросаркомы G1-G2 были живы на момент проведения исследования независимо от выявления экспрессии СОХ-2 в опухоли. Из 18 больных с хондросаркомой со степенью дифференцировки опухоли G3-G4 только у 3 выявлены СОХ-2(-)опухоли и эти пациенты живы, тогда как общая 5-летняя выживаемость 15 больных с СОХ-2(+)-хондросаркомой составила 23,2±11,7% (медиана 32,7 мес).

Полагаем, что показатели экспрессии СОХ-2 в хондросаркомах не обладают прогностической ценностью, хотя некоторые СОХ-2(+) опухоли связаны с неблагоприятным прогнозом.

Vcl-2. Проведен сравнительный анализ показателей экс-

прессии маркера, связанного с митохондриальным апоптозом в хрящеобразующих новообразованиях костей. Достоверно чаще ($p=0,004$) Vcl-2 выявляли в хондросаркомах (26 из 36, 72,2%) по сравнению с доброкачественными хрящеобразующими новообразованиями (2 из 10, 20%).

Не установлено достоверной связи частоты выявления Vcl-2 в опухолях с полом и возрастом больных с хондросаркомой.

Экспрессия Vcl-2 выявлена в 61,5% наблюдений при вторичной хондросаркоме, во всех дедифференцированных хондросаркомах и в 69,2% (13) при центральной хондросаркоме ($p=0,5$).

Частота выявления Vcl-2(-)опухолей достоверно снижалась по мере увеличения степени злокачественности хондросаркомы ($p=0,03$). Так, при G1 частота выявления Vcl-2(-)опухолей составила 62,5%, при G2 – 33,3%, при G3 – 0% и при G4 – 11,1%. Аналогичная закономерность, но только тенденция, обнаружена в группах больных с хондросаркомой с различной распространенностью опухолевого процесса (критерий T). Так, при T₁ частота выявления Vcl-2 составила 60%, при T₂ – 26,1% и 12,5% при T₃ ($p=0,17$).

Отдаленные результаты лечения больных хондросаркомой не различались между группами пациентов с Vcl-2(-) и Vcl-2(+)-опухолями, а показатели 3-летней безрецидивной выживаемости в указанных группах составили соответственно 54,7±20,1 и 30,3±10,2%. Однако показатели 5-летней общей выживаемости имели тенденцию к различию и равнялись соответственно 87,5±11,7 и 35,9±13,3%. На основании представленных результатов этот маркер не следует считать прогностическим фактором при хондросаркомах.

Vax. Показатели экспрессии Vax изучали в 10 доброкачественных хрящобразующих опухолях костей и в 38 хондросаркомах. Экспрессия маркера в доброкачественных хрящобразующих новообразованиях костей не выявлена, а в хондросаркомах обнаружена в 32 (84,2%) из 38. В 3 опухолях уровень экспрессии Vax составил 20%, в 7 – 30%. Наиболее часто обнаруживали значения экспрессии Vax, равные 40% – в 10 опухолях, в 3 – 50%, в 5 – 60%, в 3 – 70%, в 1 наблюдении – 90%.

Не установлено достоверной связи частоты выявления Vax в опухоли с полом больных с хондросаркомой, как и различий в среднем уровне экспрессии Vax(+) – соответственно 43,5±3,8 и 46,7±4,7% ($p=0,6$). Возраст больных с хондросаркомой не влиял на частоту выявления маркера.

Частота выявления вторичных Vax(-)хондросарком составила 30,8% (4 из 13) и 14,3% (2 из 14) – при центральной хондросаркоме. Во всех дедифференцированных хондросаркомах выявлена экспрессия Vax.

Частота выявления Vax(-)хондросарком недостоверно снижалась по мере увеличения степени злокачественности опухоли ($p=0,2$). Так, при G₁ частота выявления Vax(-)опухолей равнялась 37,5%, при G₂ – 15,4%, при G₃ – 12,5% и при G₄ – 0%. Средние уровни экспрессии Vax не различались достоверно в опухолях с различной степенью злокачественности. Так, при G₁ они равнялись 34±4%, при G₂ – 49,1±5,8%, при G₃ – 38,6±7,4%, при G₄ – 48,9±4,2% ($p=0,24$).

Частота выявления Vax(-)хондросарком не была достоверно связана с критерием распространенности T ($p=0,9$), но в то же время частота выявления уровня экспрессии Vax в опухоли >20% составила при T₁ – 16,7%, при T₂ – 20,8% и была наибольшей – 75% при T₃ ($p=0,05$). Несмотря на то, что частота выявления Vax в хондросаркомах не была достоверно связана с показателем T, средний уровень экспрессии маркера в хондросаркомах был наибольшим при T₃ (57,1±5,2%), а наименьшим – при T₁ (36±5,1%) ($p=0,05$).

Выявлены достоверные различия в показателях безрецидивной выживаемости больных с хондросаркомой с наличием и отсутствием экспрессии Vax ($p=0,026$). Так, показатели 3-летней безрецидивной выживаемости в вышеуказанных группах больных с Vax(-)хондросаркомой составили 66,7±19,2%, а с Vax(+) – 28,1±9,5% (медиана безрецидивной

выживаемости составила 9,6 мес). Показатели 5-летней общей выживаемости в этих группах не различались достоверно (медиана общей выживаемости 47,6 мес).

При разделении больных с хондросаркомой на 3 группы по уровню экспрессии Вах в опухоли (1-я группа – отрицательные, 2-я группа – <40%, 3-я группа – ≥40%) наихудшая 3-летняя безрецидивная выживаемость выявлена в группе 12 больных с высоким (≥40%) содержанием Вах в опухоли (18,3±11,7%, медиана безрецидивной выживаемости 7,5 мес) ($p=0,01$). У 20 больных с содержанием Вах в опухоли 10–40% 3-летняя безрецидивная выживаемость была выше – 35,6±14,1% (медиана безрецидивной выживаемости 19 мес). В то же время общая 5-летняя выживаемость в группе больных с хондросаркомой с низкой экспрессией Вах (<40%) практически не отличалась от таковой у больных с уровнями Вах в опухоли ≥40% ($p=0,95$).

Многофакторный анализ выявил, что с показателями безрецидивной выживаемости больных с хондросаркомой достоверно связан критерий Т ($p=0,004$) и не связаны показатели экспрессии Вах в опухоли ($p=0,15$), а также степень злокачественности хондросаркомы ($p=0,3$). Многофакторный анализ показателей общей выживаемости выявил преимущественную связь с отдаленными результатами лечения такого фактора, как степень злокачественности опухоли ($p=0,004$), по сравнению с отсутствием экспрессии Вах в опухоли ($p=0,48$) и критерием Т ($p=0,5$). Однако выявление уровней экспрессии Вах в хондросаркомах ≥40% можно использовать в качестве дополнительного маркера высокого риска раннего рецидивирования (рис. 9, 10, см. на вклейке).

Заключение. Известно, что тканевые, клеточные, молекулярные маркеры характеризуют специфику "биологического поведения" конкретной злокачественной опухоли, а именно проявления фундаментальных свойств опухолевых клеток, таких, как неограниченная пролиферация, активное пролиферирование, инвазия и метастазирование, способность противостоять апоптозу, чувствительность к экзогенным и эндогенным регуляторам. На основании изучения фенотипических молекулярно-биологических особенностей сарком костей возможно создание новой стратегии лечения, непосредственно влияющей на определенные молекулы и процессы. Возможно также выявление новых мишеней для более эффективной "таргетной" терапии опухолей, основанной на модификации системы передачи регуляторных сигналов в клетке. Кроме того, изучение биологии сарком костей важно в клинической практике для выявления прогностических маркеров и выделения групп риска среди обследованных пациентов, которые нуждаются в более пристальном динамическом наблюдении и дополнительной агрессивной терапии. Иммуногистохимические, молекулярные и генетические исследования выявили новые, достаточно чувствительные, но не всегда специфичные иммуногистохимические маркеры, хромосомные транслокации и молекулярные мутации в костных опухолях. Однако иммуногистохимический метод в условиях свершившейся опухолевой трансформации клеток следует считать наиболее

удобным при изучении клеточных и тканевых маркеров в различных опухолях, в том числе и при саркомах костей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bertoni F, Bacchini P, Hogendoorn P.C.W. Chondrosarcoma. In: Fletcher C.D.M, Unni K.K., Mertens F. (editors). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. Lyon: IARC Press. 2002; 247–51.
2. Hogendoorn P.C.W., Bovee J.V.M.G., Nielsen G.P. Chondrosarcoma (grades I-III), including primary and secondary variants and periosteal chondrosarcoma. In: Fletcher C.D.M., Bridge J.A., Hogendoorn P.C.W., Mertens F., editors. World Health Organization of Tumors of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC Press. 2013; 264–72.
3. Aigner T. Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasms of the skeleton-biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants. *Viechows Arch.* 2002; 441: 219–30.
4. Rizzo M., Ghert M.A., Harrelson J.M. Chondrosarcoma of bone: analysis of 108 cases and evaluation for predictors of outcome. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2001; 391: 224–33.
5. Pring M.E., Weber K.L., Unni K.K., Sim F.H. Chondrosarcoma of the pelvis: a review of sixty-four cases. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2001; 83: 1630–42.
6. Fiorenza F., Abudu A., Grimer R.J. Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2002; 84: 93–9.
7. Lee F.Y., Mankin H.J., Fondren G. Chondrosarcoma of bone: an assessment of outcome. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1999; 81: 326–38.
8. Berend K.B., Toth A.P., Harrelson J.M., Layfield L.J. Association between ratio of matrix metalloproteinase-1 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and local recurrence, metastasis and survival in human chondrosarcoma. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1998; 80-A (1): 11–17.
9. Rodgers U.R., Kevorkian L., Surridge A.K., Waters J.G., Swingler T.E., Culley K., Illman S., Lohi J., Parker A.E., Clark I.M. Expression and function of matrix metalloproteinase(MMP)-28. *Matrix Biol.* 2009; 28 (5): 263–72.
10. Shinmura K., Ishida T., Goto T. Expression of cyclooxygenase-2 in chondroblastoma: immunohistochemical analysis with special emphasis on local inflammatory reaction. *Virchows Arch.* 2004; 444: 28–35.
11. Sutton K.M., Wright M., Fondren G. Cyclooxygenase-2 expression in chondrosarcoma. *Oncology.* 2004; 66: 275–80.
12. Endo M., Matsumura T., Yamaguchi T., Yamaguchi U., Morimoto Y., Nakatani F., Kawai A., Chuman H., Beppu Y., Shimoda T., Hasegawa T. Cyclooxygenase-2 overexpression associated with a poor prognosis in chondrosarcoma. *Hum. Pathol.* 2006; 37 (4): 471–6.
13. Dannenberg A.J., Lippman S.M., Mann J.R. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 254–66.
14. Chun K., Surh Y. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem. Pharm.* 2004; 68: 1089–100.
15. Grifone T.J., Haupt H.M., Podolski V., Brooks J.J. Immunohistochemical expression of estrogen receptors in chondrosarcomas and enchondromas. *Int. J. Surg. Pathol.* 2008; 16 (1): 31–7.

Поступила 01.07.13

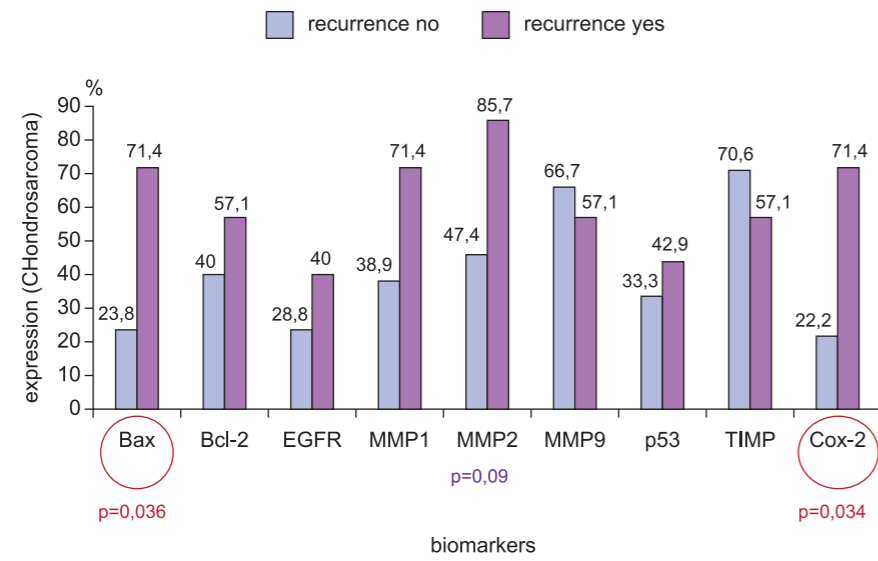


Рис. 9. Экспрессия биомаркеров в высокодифференцированной хондросаркоме с учетом безрецидивной выживаемости.

Fig. 9. Expression of biomarkers in low-grade chondrosarcomas.

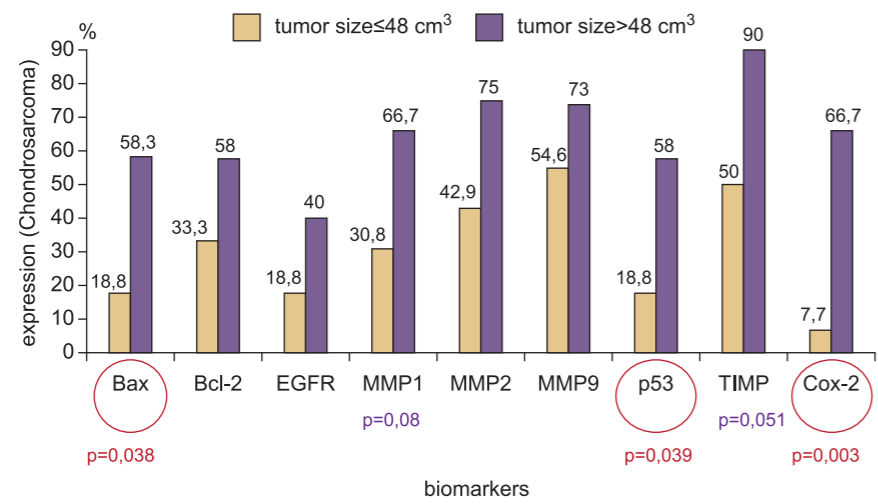


Рис. 10. Взаимосвязь экспрессии биологических маркеров в хондросаркоме в зависимости от степени дифференцировки, максимального объема опухоли и безрецидивной выживаемости.

Fig. 10. The expression of the markers was significantly associated with the histologic grade of the tumor, tumor size and the recurrence rate.

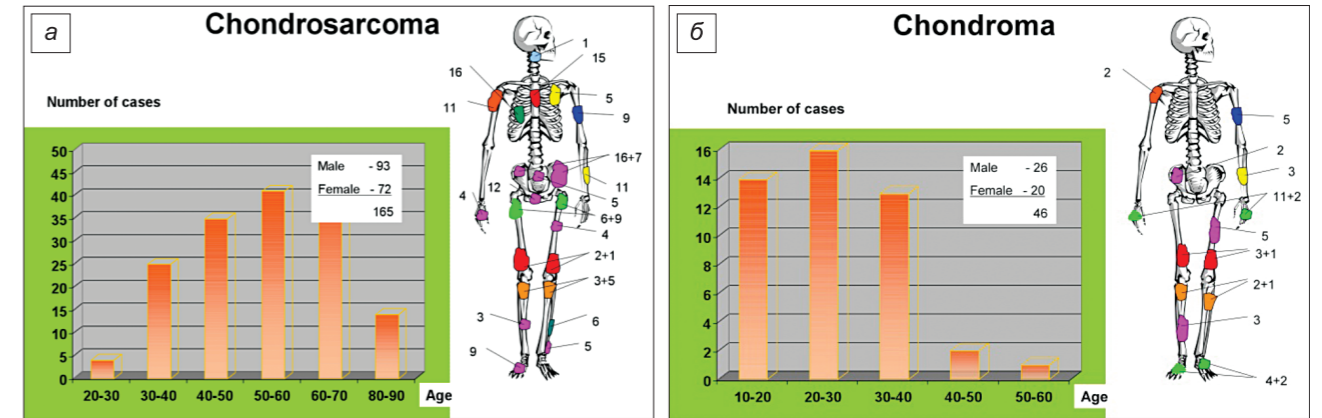


Рис. 1. Распределение больных с хондросаркомой (а) и хондромой (б) в зависимости от возраста, пола и локализации очага поражения в костях скелета.

Fig. 1. Distribution of chondrosarcoma (a) and condroma (b) by age, sex of the patient and site of the lesion.



Рис. 2. Макропрепарат. Хондрома проксимального отдела малоберцовой кости.

Fig. 2. Enchondroma involving the proximal fibular. Gross specimen, the chondroid lesion appear multilobular. There are some areas of calcification.

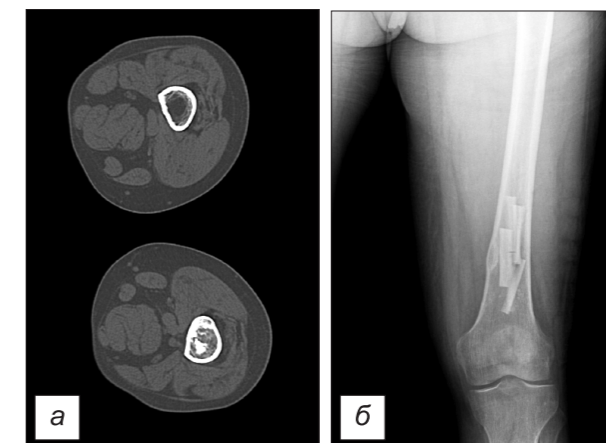


Рис. 3. Атипичная хондрома проксимального отдела левой бедренной кости (а). В корковом слое кости структура дополнительного новообразования, напоминающего метафизарный фиброзный дефект (б).

Fig. 3. Atypical chondroma involving long tubular bone (a). The lesion has the multilobated appearance, there is no permeation into soft tissue and an additional MFD-like structure (b).



Рис. 4. Атипичная хондрома бедра (а) и проксимального отрезка малоберцовой кости (б). Дольчатые, четко очерченные, частично кальцинированные опухолевые включения в костно-мозговом канале обеих костей.

Fig. 4. Atypical chondroma. Calcified, multilobated lesion of the distal femur (a). The lesion is well demarcated, but some areas are questionable about the cortex involvement (b).

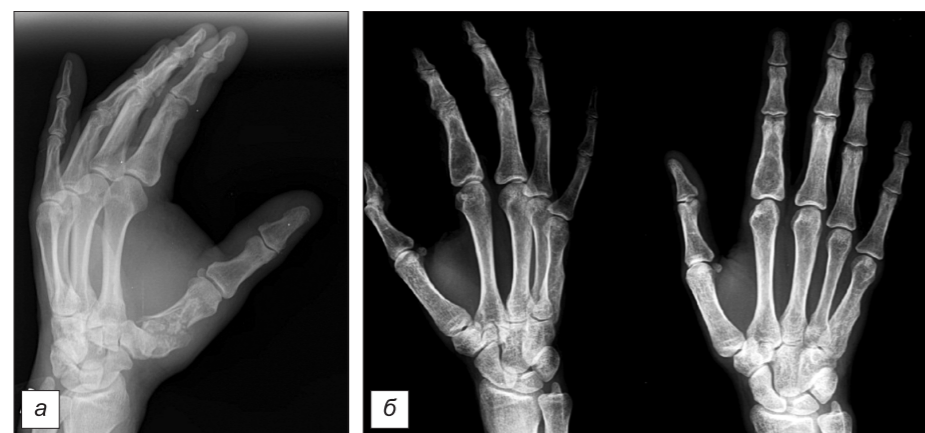


Рис. 5. Хондрома мелких костей кисти. Истончение кортикального слоя кости, патологический перелом основной фаланги первого пальца левой кисти (а). Истончение кортикальной пластинки средней фаланги второго пальца правой кисти (б).

Fig. 5. Enchondroma, involving small tubular bones of the hand. This thinning of the cortex leads to frequent pathologic fractures in enchondromas of small bones (a). The cortex is uniformly thin, but there is no permeation into the soft tissue (b).

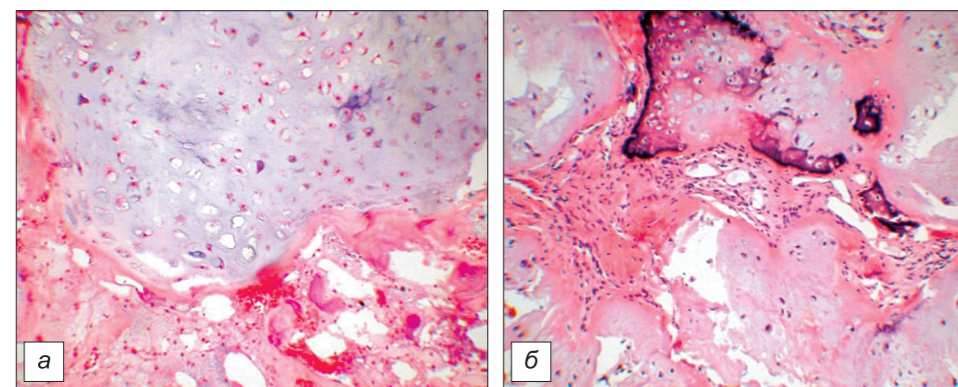


Рис. 6. Хондрома бедренной кости. Ишемические изменения ядер отдельных клеток (а), очаговый кальциноз (б). Микропрепарат. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200, ув. 100.

Fig. 6. High power appearance of an enchondroma with focal calcifications. The lesion is cellular with some ischemic changes, that mimic atypia. These cytologic changes can be ignored if the roentgenograms show a benign process (a, b). Histopathologic features.

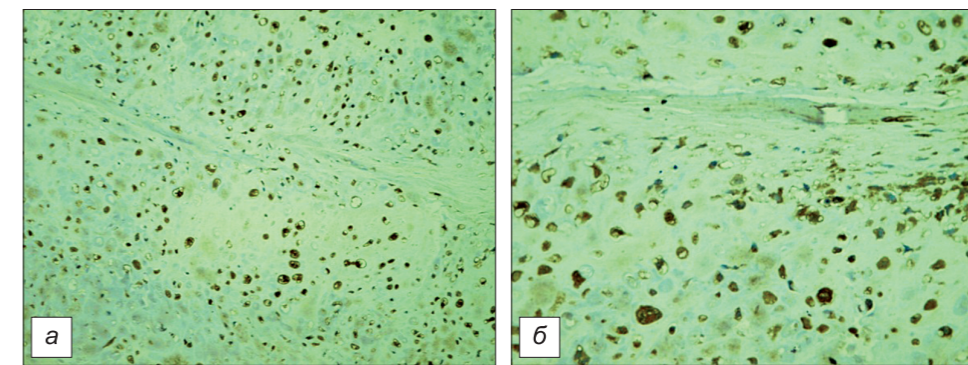


Рис. 7. Высокодифференцированная (grade 1) хондросаркома. Иммуногистохимическая реакция с COX-2, диффузная, выраженная реакция клеток опухоли (а, б). Микропрепарат. Ув. 100, ув. 200.

Fig. 7. Diffuse and strong immunoreactivity for COX-2 in a grade 1 chondrosarcoma (a, b).

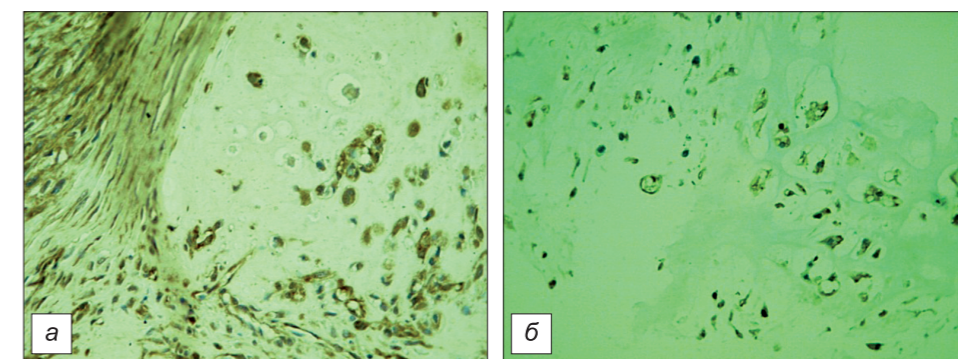


Рис. 8. Высокодифференцированная (grade 1) хондросаркома. Цитоплазматическая реакция клеток с коллагеном 4-го типа (а, б). Микропрепарат. Ув. 200.

Fig. 8. Cytoplasmic immunostain for Coll IV. Strong and moderate expressions in grade 1 chondrosarcoma cells (a, b).